

# 川崎病発症におけるスーパー抗原 Streptococcal pyrogenic exotoxin Cの関与

著者	吉岡 健
号	3233
発行年	2001
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/22210">http://hdl.handle.net/10097/22210</a>

氏 名（本籍）	よし 吉	おか 岡	たけし 健
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）		
学 位 記 番 号	医 第 3 2 3 3 号		
学位授与年月日	平 成 13 年 3 月 7 日		
学位授与の条件	学位規則第4条第2項該当		
最 終 学 歴	平 成 4 年 3 月 31 日 神戸大学大学院農学研究科修士課程 植物防疫学専攻修了		
学 位 論 文 題 目	Definition of streptococcal Pyrogenic Exotoxin C as a causative superantigen for Kawasaki disease （川崎病発症におけるスーパー抗原 Streptococ- cal pyrogenic exotoxin C の関与）		
	(主 査)		
論 文 審 査 委 員	教授 伊 藤 恒 敏	教授 飯 沼 一 宇	
	教授 佐々木	毅	

# 論文内容要旨

## 研究目的

川崎病 (KD) の臨床症象は、レンサ球菌感染により起こされる猩紅熱に似ていることから、最も疑われた原因の一つにレンサ球菌感染が挙げられていた。しかしながら、KD 患者では抗生物質が効かない等の意見より、この説は否定されてきた。1990 年代に入り、川崎病患者末梢血を用いた T 細胞レセプター (TCR) 可変 (V) 領域レパトア解析より、KD 発症原因が連鎖球菌などが産生する毒素、スーパー抗原 (SA) である可能性が指摘された。SA はごく少量で、多くの T 細胞を非特異的に活性化し、免疫系の破綻をもたらすことから、再びレンサ球菌等 SA 産生菌の、本疾病への関与が言われはじめた。しかし、TCR レパトア解析に用いられている方法の多くは、正確性に欠けたり、全ての TCR V 鎖を認識できず不完全なものであるため、現在までその原因となりうる SA の同定には至っていない。そこで、我々は、新規に簡便・正確な TCR V 領域レパトア解析系を構築すると共に、KD 発症原因の同定を目的とし、実験を行った。

## 研究方法

TCR 遺伝子群を偏り無く増幅する Adaptor-ligation PCR (AL-PCR) 法と、増幅した TCR 遺伝子群を一度に解析する Reverse dot blot hybridization (RDBH) 法を組み合わせることで、簡便かつ正確な TCR V 領域レパトア解析系を構築した。

急性期・回復期 KD 患者 22 名、他の炎症性疾患コントロール 14 名、健常大人 10 名の末梢血を用い、TCR レパトア解析、サイトカイン産生状況、抗 streptococcal pyrogenic exotoxin A 及び C (SPE-A, SPE-C) 抗体価、HLA-DRB1 遺伝子頻度を調査した。TCR レパトア解析で変化の認められたものについては、10 クローンづつ、その抗原決定 (CDR3) 領域の塩基配列を決定した。また、成人末梢血を用い In vitro での SPE-A, SPE-C 刺激実験も、これに並行しておこなった。

## 研究結果

① 新規 TCR レパトア解析系は、従来より用いられてきた方法に比べ、簡便性・正確性に優れていることが確認された。② KD 患者末梢血中で、TCRBV2 及び TCRBV6S5 ポジティブ T 細胞のポリクローナルな増加が確認された。鎖に於いては如何なる変化も検出されなかった。③ 例数が少なく引き続き解析が必要であるが、KD 患者の HLA-DRB1 遺伝子頻度に、日本人平均と比べ偏りが認められた。④ TCRBV2 及び TCRBV6S5 に選択性を有する SA が SPE-C であるこ

とが確認された。⑤ KD 患者は、同年齢群のそれと比較して、高い抗 SPE-C 抗体価を示した。⑥ KD 患者におけるサイトカイン産生状況が、In vitro での SPE-C 刺激後のそれと類似していた。

## 結 論

我々の構築した TCR V 領域レパトア解析系は、簡便性・正確性に優れていることが確認された。また、本法は、T 細胞が関与していると思われる疾患の病因解明において、有力な道具になると思われる。

TCRBV2 及び TCRBV6S5 ポジティブ T 細胞のポリクローナルな増加が、KD 患者及び SPE-C 刺激後の検体で認められたことから、KD 発症に SPE-C の関与が疑われた。また、サイトカイン産生状況や抗 SPE-C 抗体価のデータは、同様に、患者が SPE-C に曝されたことを示唆した。川崎病患者で認められた HLA-DRB1 遺伝子頻度の偏りには、以下の可能性、① HLA 分子と SA の親和性の差 ② 連鎖球菌に対する免疫応答の差が、その個体が有する HLA により存在 ③ HLA-DRB1 と連鎖する他の遺伝子の影響、を考慮しており、今後の重要な検討課題である。

## 研究の意義・独創的な点

KD 患者における TCR レパトア解析は、国内外の研究機関などで成されてきた。しかしながら、その解析結果は、研究者毎、中には報告毎に異なるのが現状であった。我々は、その理由を彼らの用いた TCR レパトア解析法に在るとして、従来より存在する抗体を用いた方法や、現在市販の PCR を利用した物よりも、簡便かつ正確な解析系の構築を行った。本法を用いることで始めて、発症期 KD 患者末梢血中で、TCRBV6S5 ポジティブ細胞のポリクローナルな増加が検出できたと考える。そして、In vitro 刺激実験等の結果より、KD 発症に SPE-C の関与が示唆されたことは、大変重要な知見であると考ええる。また、我々の TCR レパトア解析系は、他の多くの免疫応答異常により起こされたと考えられる疾患の原因究明に対し、有力な武器となると思われる。

# 審 査 結 果 の 要 旨

## 論文背景と目的

川崎病 (KD) の発症因は、その臨床像や発症状況などから、何らかの感染により引き起こされると考えられてきた。1990年代に入り、レンサ球菌やブドウ球菌等の産生する毒素 (スーパー抗原 ; SA) が、ごく少量で T 細胞を、T 細胞レセプター  $\beta$  鎖可変 (TCRBV) 領域に選択性をもって活性化し、トキシックショックシンドロームや、猩紅熱、エルシニア感染症を引き起こすと考えられはじめた。これら疾患と臨床像の似ている KD においても、これら SA の関与が言われてきたが、現在までにどの SA により KD が、引き起こされるのか同定されていない。本論文は、KD 発症に SA が関与しているのか、また、どの SA が関与しているのかを調べることを目的としている。

## 論文要旨

本論文で著者は以下の研究結果を報告している。極微量の SA は、TCRBV 鎖に選択性を持って T 細胞を活性化することから、KD 発症期患児末梢血の TCR レパトアを解析することで、該当 SA の残すであろう痕跡を見つけることが出来るのではないかと考えられてきた。しかしながら、現在、広く一般的に用いられている TCR レパトア解析法では、検出できない TCRBV 鎖も存在することから、新規 TCR レパトア解析系を構築することが必要であった。今回、著者は、アダプター DNA を利用したワンサイド PCR (アダプターライゲーション PCR ; AL-PCR) と、予め TCRV 鎖対応 DNA プローブを固相しておくリバースドットプロットハイブリダイゼーション (RDBH) 法を組み合わせることで、簡便かつ信頼性の高い TCR レパトア解析系の構築に成功している。次に、著者は、本法を用い、KD 患者末梢血中の TCR レパトア解析を行うことで、発症期において、TCRBV2 及び TCRBV6S5 のポリクローナルな増加を報告している。この結果は、KD 発症にスーパー抗原の関与を示唆するものである。更に、著者は、レンサ球菌由来 SA によるインヴィトロ刺激実験より、Streptococcal pyrogenic exotoxin C (SPE-C) が、TCRBV2 及び TCRBV6S5 に選択性を有していることを確認している。また、患児血清中の抗 SPE-C 抗体価が高いこと、サイトカイン産生状況が SPE-C 刺激後のそれと類似していることから、KD 発症に SPE-C が深く関与していることを示している。

## 論文評価

これまで困難とされてきた川崎病発症に関与していると考えられるスーパー抗原 (SPE-C) の同定を、全ての TCRBV レパトアを解析することで行った初めての論文である。更には、論文中で採用されている TCR レパトア解析系は、従来のものより、その操作性・正確性で優れていることを示しており、今後多くの疾患で本法が採用されることが予見され、十分に医学博士に値すると判定する。